

PAT-NO: JP358141798A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 58141798 A
TITLE: ANALYSIS OF POLYAMINE
PUBN-DATE: August 23, 1983

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
OKADA, MASATO	
YOSHIMURA, YOSHINORI	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
TOKUYAMA SODA CO LTD	N/A

APPL-NO: JP57022699
APPL-DATE: February 17, 1982

INT-CL (IPC): C12Q001/26 , C08G073/02 , C12N009/02 , C12R001/265

US-CL-CURRENT: 435/25, 435/189, 435/858

ABSTRACT:

PURPOSE: To determine a polyamine, in high reproducibility, by using a putrescine oxidase derived from *Micrococcus flavidus* as an enzyme and trichloroacetic acid as a desorbing agent.

CONSTITUTION: A polyamine such as spermidine, putrescine, etc. is adsorbed to an adsorbent, preferably a carboxylic acid-type weakly acidic anion exchange resin, and desorbed by using trichloroacetic acid as the desorbing resin, and desorbed by using trichloroacetic acid as the desorbing agent. The resultant polyamine solution is made to react with a putrescine oxidase derived from *Micrococcus flavidus* preferably at 7.0-8.5pH and 10-40°C. The produced hydrogen peroxide is determined by colorimetry using a proper reagent.

COPYRIGHT: (C)1983,JPO&Japio

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—141798

⑮ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和58年(1983)8月23日

C 12 Q 1/26

8213—4B

C 08 G 73/02

7445—4J

// C 12 N 9/02

7236—4B

C 12 R 1/265

6760—4B

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑭ ポリアミンの分析法

株式会社内

⑮ 特 願 昭57—22699

⑯ 発 明 者 吉村佳典

徳山市御影町1番1号徳山曹達

⑮ 出 願 昭57(1982)2月17日

株式会社内

⑯ 発 明 者 岡田昌人

⑰ 出 願 人 徳山曹達株式会社

徳山市御影町1番1号徳山曹達

徳山市御影町1番1号

明 細 書

1. 発明の名称 ポリアミンの分析法

2. 特許請求の範囲

(1) ポリアミンを収着させた収着体から脱着剤を用いてポリアミンを脱着し、得られたポリアミン溶液に酵素を作用させて生じる過酸化水素を検出して行なうポリアミンの分析法において、脱着剤としてトリクロロ酢酸を用い、且つ酵素としてミクロコッカス・フラビダス系のプロレシン・オキシダーゼを用いることを特徴とするポリアミンの分析法。

(2) ポリアミンがスベルミジンである特許請求の範囲第(1)項記載の分析法。

(3) 収着体が陽イオン交換樹脂である特許請求の範囲第(1)項記載の分析法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はポリアミンの分析法就中尿中ポリアミンの分析法に関する。ポリアミンは、生物界に広く分布しているが、増殖の著しい細胞中に含量が高く、特に腫瘍細胞中での含量が高いことから医

学上で重要視されている。また、癌患者の体液例えば血液、尿等の中のポリアミン含量は健康人に比べて高いことが、1975年ラッセル等により示された。それ以後、癌と体液中のポリアミンの濃度との相関性が多くの研究者によつて調べられ、ラッセル等の研究結果の妥当性が確かめられている。

しかし乍ら、体液中のポリアミンの定量は、その濃度が低いこととポリアミン以外の種々の夾雑物が含まれていることから非常に困難である。

現在、最も信頼性の高いポリアミン定量法は、高速液体クロマトグラフィーを使用する方法である。しかし、この方法を使つた分析所要時間は一機体について、一時間以上であるために、研究レベルまでの分析法としての域を脱していない。

一方、体液中のポリアミン濃度を迅速に分析することを目的として酵素法が注目されている。酵素法によるポリアミン定量分析の原理は、ポリアミン分解酵素を用いてポリアミンより検出容易な生成物を得て、その生成物を検出するものである。

しかし、酵素法によるポリアミン定量においてポリアミン分解酵素として何を選択するかが問題となる。その一つとして、プトレシン・オキシダーゼが挙げられる。プトレシン・オキシダーゼなる酵素は、足立等により、マイクロコツカス・ローゼウス中に見出されている〔アグリカルチャラル・イオロジカル・ケミストリー・30巻、1202(1966)〕。しかし、上記マイクロコツカス・ローゼウスから得られる酵素を酵素法によるポリアミン定量に適用する場合、次の欠点を有する。即ち、(1)マイクロコツカス・ローゼウスは菌体内に蓄積するプトレシン・オキシダーゼの量が少なく、酵素の調製が煩雑である。(2)マイクロコツカス・ローゼウスの細胞壁は非常に強固であり、菌体内からプトレシン・オキシダーゼを抽出する際、特殊な機器を使つて菌体を破砕し酵素を抽出しなければならない。(3)マイクロコツカス・ローゼウスから得られるプトレシン・オキシダーゼのプトレシンに対するミカエリス定数 K_m 値が比較的大きい ($1.2 \times 10^{-4} M$) のため、非常に微量のポリ

アミン ($10^{-7} \sim 10^{-8} M$) を定量する場合に酵素反応速度が遅くなり、従つて定量時間が長くなるという欠点がある。

本発明者等は、上記3点の欠点すなわちプトレシン・オキシダーゼの収率が低いこと、菌体の破砕が困難であること、及びプトレシンに対するミカエリス定数 K_m 値が大きいことを解決するために、各種微生物中のプトレシン・オキシダーゼの検索を行い、マイクロコツカス・ローゼウス系のものに比較して、酵素生産性が30倍以上高く、菌体内の酵素比活性が8倍以上高く、さらに細胞破砕が容易なために酵素精製が容易であり、酵素回収量が多いプトレシン・オキシダーゼの製造方法を発明し、先に提案した(特願昭55-92792号、特開昭57- 号)。

本発明は、上記の製造方法により得られるマイクロコツカス・フラビダス系のプトレシン・オキシダーゼを用いるポリアミンの分析法である。

一般に、酵素法によるポリアミン定量分析は、例えば尿中のポリアミンを適当な吸着体に吸着さ

せた後、脱着剤を用いてポリアミンを脱着し、得られたポリアミン溶液に酵素を作用させて生じる過酸化水素を比色定量して行なわれる。然るに、酵素として、マイクロコツカス・フラビダス系のプトレシン・オキシダーゼを用いた場合、脱着剤として従来使用されている塩酸、硫酸などの酸溶液あるいは食塩を代表とする塩類を含有する水溶液を用いると、スベルミジンなどポリアミンの種類によつては、比色定量における発色強度が不安定で、且つ再現性がないという欠点があることが判明した。

本発明は、かかる課題を解決すべくなされたものである。

即ち、本発明は、ポリアミンを吸着させた吸着体から脱着剤を用いてポリアミンを脱着し、得られたポリアミン溶液に酵素を作用させて生じる過酸化水素を検出して行なりポリアミンの分析法において、脱着剤として、トリクロロ酢酸を用い、且つ酵素としてマイクロコツカス・フラビダス系のプトレシン・オキシダーゼを用いることを特徴と

するポリアミンの分析法である。

ポリアミンとしては、スベルミジン、プトレシン、スベルミンなどが挙げられるが、本発明を用いて特に有効なのは、スベルミジンであつて、以下、スベルミジンをポリアミンの代表として説明する。

スベルミジン例えば尿中スベルミジンに酵素を作用させて生成する過酸化水素を、比色定量する際には、発色の妨害物質を除去する目的で、スベルミジンを含有する尿を適当な吸着体に接触させてスベルミジンを吸着させ、発色妨害物質を分離除去した後、脱着剤により、発色妨害物質を含まないスベルミジン溶液を得て行なり。

吸着体としては、特に限定されず、陽イオン交換樹脂、セルロースイオン交換体その他が挙げられるが、好ましくは、陽イオン交換樹脂が用いられる。陽イオン交換樹脂としては、通常の各種陽イオン交換樹脂が用いられるが、比較的溫和な条件でスベルミジンを脱着させることができるという理由で、カルボン酸型の弱酸性陽イオン交換樹

脂が特に好ましく用いられる。また、尿試料としては、採尿されたままの未処理尿でもよいが、例えば、アシルポリアミン・アミドヒドロラーゼ（特開昭56-144088）を用いて加水分解処理した尿を用いてもよい。

本発明の最大の特徴は、酵素としてマイクロコッカス・フラビダス系のプロトレシン・オキシダーゼを用いることと共に、脱着剤としてトリクロロ酢酸を用いることである。トリクロロ酢酸は、通常の市販品あるいは生化学用等級のものなどが任意に用いられ、その濃度としては、通常0.1～1.0Nであるが、特に0.2～0.5Nのものが好ましく用いられる。トリクロロ酢酸の使用量は、通常吸着体/容に対して2～30容の範囲である。また、トリクロロ酢酸を用いて、脱着する方法は、従来の塩酸、硫酸などを用いる場合と同様に、ポリアミンを吸着させた吸着体をカラム等に充填し、脱着剤をカラム上部から供給して行くとよい。トリクロロ酢酸を用いて脱着して得られたスベルミジン溶液にマイクロコッカス・フラビダ

ス系のプロトレシン・オキシダーゼを作用させる。マイクロコッカス・フラビダス系のプロトレシン・オキシダーゼとは、マイクロコッカス・フラビダスの培養物から得られるプロトレシン・オキシダーゼであつて、その製造方法の概略は後述するが、その詳細は、前記したように本発明者等が先に提案し、特開昭57-18984号として公知である。マイクロコッカス・フラビダス（*Micrococcus Flavivus*）は、上記の特開昭57-18984号に記載されるように、本発明者等が見出したマイクロコッカス属に属する新種と認められるものであつて、新しく命名し、微生物保管委託申請書受理番号5633として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託しているものである。

トリクロロ酢酸を用いて脱着して得られたスベルミジン溶液にマイクロコッカス・フラビダス系のプロトレシン・オキシダーゼの酵素を作用させる際通常は、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン溶液などのアルカリ溶液でスベルミジン溶液を中和して後に、該酵素を作用させるとよい。

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン溶液の濃度としては、一般に、0.2～2.0モル濃度のものが好ましく用いられる。

また、スベルミジン溶液にマイクロコッカス・フラビダス系のプロトレシン・オキシダーゼを作用させる際の反応条件は、特に限定されないが、反応液のpHが7.0～8.5特に7.5～8.0であることが反応速度が速いという点で好ましい。その他の条件としては温度が10～40℃特に20～35℃の条件を満足するようにして行う方が好ましい。トリクロロ酢酸を用いて脱着して得られたスベルミジン溶液にマイクロコッカス・フラビダス系のプロトレシン・オキシダーゼを作用させると、スベルミジン溶液中に含まれるスベルミジンの量即ち、尿中に含まれていたスベルミジンの量に応じて、過酸化水素が生成する。この過酸化水素を適当な試薬で比色定量すればよい。試薬としては、通常、4-アミノアンチピリン/ジクロロフェノール/ペルオキシダーゼ系のものが好ましく使用される。

本発明の効果上の最大の特徴は、比色定量において、発色強度が安定化し、且つ再現性が得られることである。即ち、マイクロコッカス・フラビダス系のプロトレシン・オキシダーゼは、前記したように、酵素生産性、酵素比活性及び細胞破砕の点で有利であるが、これを用いた場合、脱着剤として、従来使用されている塩酸、硫酸などの酸溶液あるいは食塩などの塩類水溶液を用いると発色強度が不安定で、再現性がなく、比色定量により、尿中に含まれるスベルミジンの量を分析することは、實際上、不可能である。然るに、脱着剤として、トリクロロ酢酸を用いた場合は、尿中に含まれるスベルミジンの量に比例した発色強度が常に得られるものである。マイクロコッカス・フラビダス系のプロトレシン・オキシダーゼを用いた場合のこのような特異な現象は、全く意外である。このような特異な現象がみられる理由は、明らかでないが、本発明者等は、一応次のように推測している。すなわちマイクロコッカス・フラビダス系のプロトレシン・オキシダーゼは、通常の条件下ではス

ペルミジンの2級アミノ基のみを酸化するのではなく、末端の1級アミノ基も酸化するが、トリクロロ酢酸存在下では、スペルミジンの2級アミノ基のみを選択的に酸化し、スペルミジン/当量に対して安定に/当量の過酸化水素を発生させるものと推定している。

また、本発明で用いるミクロコツカス・フラビダスの菌学的性質は、以下に示す通りである。尚、色の表示は『色の規準』（日本色彩社発行、1951年版）に従った。

(II) 形態

培地として肉汁および肉汁寒天培地を使用した。

① 細胞の形および大きさ

球形。培養初期から中期にかけて二連球となる。 $0.5 \sim 0.9 \mu\text{m}$ (直径)

② 細胞の多形性

なし

③ 運動性

なし(鞭毛なし)

アルカリ性、ミルクの液化と凝固はともになし。

(III) 生理学的性質

① 硝酸塩の還元	陽性
② 脱窒反応	陰性
③ MRテスト	陰性
④ VPテスト	陰性
⑤ インドールの生成	陰性
⑥ 硫化水素の生成	陰性
⑦ アンプンの加水分解	陰性
⑧ クエン酸の利用	陽性
⑨ 無機窒素源の利用	陽性
⑩ 色素の生成	陰性
⑪ ウレアーゼの生成	陽性
⑫ オキシダーゼ	陰性
⑬ カタラーゼ	陽性
⑭ 生育の範囲	

pH $5.0 \sim 10.0$

温度 $20 \sim 38^\circ\text{C}$

⑮ 酸素に対する態度	好気性
------------	-----

① 胞子

なし

② グラム染色性

陽性

③ 抗酸性染色

陰性

(2) 各培地における生育状態

① 肉汁寒天平板培養

生育良好、円形、凸状、不透明、にぶ色 (dull yellow)、可溶性色素の生産なし。

② 肉汁寒天斜面培養

生育良好、線状に生育、不透明、にぶ色 (dull yellow)、可溶性色素の生成なし。

③ 肉汁液体培養

生育良好、均一に混濁、菌膜の形成なし、沈殿の生成なし、セグメントの生成なし。

④ 肉汁ゼラチン穿刺培養

表面に生育、生育中程度、ゼラチンの液化なし。

⑤ リトマス・ミルク培養

⑥ O-Fテスト (Hugh Lelison法)

糖を分解しない

⑦ 糖類からの酸の生成

L-アラビノース	陰性	トレハロース	陰性
D-キシロース	陰性	D-ソルビット	陰性
D-グルコース	陰性	D-マンニット	陰性
D-マンノース	陰性	イノシット	陰性
D-フラクトース	陰性	グリセリン	陽性
D-ガラクトース	陰性	乳糖	陰性
麦芽糖	陰性	デンプン	陰性
シロ糖	陰性		

すべての糖類についてガスの発生は観察されず

また、ミクロコツカス・フラビダスから、プトレシン・オキシダーゼを得るには以下のようにすればよい。

まず上記の微生物をプトレシンを含有する培地下、酵素などを生産する通常の方法で培養する。培養の形態は液体通気培養が有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用される。炭素源としては同化可能

な炭化水素であれば良く、例えばグルコース、糖蜜、グリセリンなどが使用される。窒素源としては、利用可能な窒素化合物であれば良く、例えばペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーン、ステイービ、リカー、硫酸、塩安などが使用される。その他、食塩、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウムなどの塩類が必要に応じて使用される。

また、培地中にプトレシンあるいはスベルミジンを添加せしめて、培養時プトレシン・オキシダーゼの生産能を上升せしめることが好ましい。添加するプトレシンとスベルミジンを比較した場合、価格とプトレシン・オキシダーゼの生産能の上升効果の点からプトレシンの方が有利である。プトレシンあるいはスベルミジンの添加量としては0.05～1.0%の範囲で、好ましくは0.1～0.5%程度添加される。培養温度は菌が発育しプトレシン・オキシダーゼを生産する範囲内が良いが、好ましくは25～35℃である。培養時間は条件によつて多少異なるが、通常5～30時

間程度であつて、菌の生育が定常相 (stationary phase) に達した時期に培養を終了すればプトレシン・オキシダーゼ生産が最高に達する。かくして得られた培養物中においてプトレシン・オキシダーゼはその菌体内に含有、蓄積される。

この様にして得られた培養物中よりプトレシン・オキシダーゼを抽出し、粗製のプトレシン・オキシダーゼ含有液を得るためには、例示すれば、まず培養物を遠心分離等の手段で固液分離し、得られる湿菌体を必要に応じてリン酸緩衝液やトリス塩酸緩衝液などに懸濁せしめ、次いで超音波破砕処理やダイノミルによる破砕処理リゾチーム処理などの菌体処理手段を通宜選択組合せて、菌体内よりプトレシン・オキシダーゼを抽出し、粗製のプトレシン・オキシダーゼ含有液を得る。

さらにこの粗製プトレシン・オキシダーゼ含有液を公知の蛋白質、酵素などの単離、精製手段を使用して処理することにより精製されたプトレシン・オキシダーゼを得ることが出来る。

次に、実施例及び比較例を挙げるが、本発明は、これらに限定されるものではない。

実施例 - 1

尿100mlを採取し、1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いてpHを7.8に調整した後、3,000 rpmで10分間の遠心分離により沈殿物を除去した上清に、最終濃度が20 mMとなるようにスベルミジン水溶液を添加した。

このようにして調製した尿試料溶液8mlを陽イオン交換樹脂バイオレット70 (バイオ・ラド社製、カルゲン酸型) のミニカラム (樹脂量0.2 ml) に通過させた。

イオン交換水5.0 mlでミニカラムを洗浄後、0.2 Nトリクロロ酢酸で溶出し、溶出液3.0 mlを得た。

溶出液中のスベルミジンをマイクロツカス・フラビダスより精製したプトレシン・オキシダーゼを用いて酵素的定量を行つた。検出はプトレシン・オキシダーゼがスベルミジンに作用して生成する過酸化水素を4-アミノアンチピリン/ジクロロフェノール/ペルオキシダーゼ系で発色せしめることにより行つた。

アッセイ液

0.1 M トリス塩酸緩衝液	100ml
含 4-アミノアンチピリン	12mg
ジクロロフェノール	4.8mg
ペルオキシダーゼ	4mg
プトレシン・オキシダーゼ	100units

溶出液1.0 mlに0.5 M トリス溶液0.15 mlを加えて中和した後、上記アッセイ液1.0 mlを加えて30℃で反応させ、514 nmの吸光度: OD_{514} を測定した。その結果、部1表に示すように反応開始後約30分で一定の吸光度を示すようになり、その値は60分後でも変化せず安定であつた。

また、第1-図に吸光度の経時変化の様子を示す。

比較例-1

実施例-1に示した中で0.2Nトリクロ酢酸を0.2N塩酸に代えた以外は実施例に示したと同一の操作を行ない、514 nm の吸光度； OD_{514} を測定したところ、第2表に示すように OD_{514} は一定値を示さず吸光度は反応開始後60分でも増加し続けていた。

第1表

反応時間 (分)	5	10	15	20	25	30	45	60
OD_{514}	0.112	0.201	0.249	0.276	0.292	0.294	0.294	0.294

また、吸光度の経時変化の様子を第1-図に示す。

実施例-2

実施例-1に示した中で最終スメルミジン濃度を0、10、20、30、40及び50 μ Mと変化させた以外は実施例-1に示したものと同一の操作を行なつて、30分後の514 nm の吸光度； OD_{514} を測定した結果は第3表の通りであつた。

第2表

反応時間 (分)	5	10	15	20	25	30	45	60
OD_{514}	0.118	0.210	0.261	0.290	0.308	0.321	0.340	0.355

第 3 表

50	0.700
40	0.566
30	0.424
20	0.294
10	0.161
0	0.022
スベルミジン濃度 (μM)	OD_{514}

第 4 表

OD_{514}	OD_{514} よりの計算値 (μM)	HPLC 分析値 (μM)
0.178	11.5	11.2
0.195	12.8	13.3
0.314	21.5	21.0
0.408	28.5	28.8
0.563	39.9	40.3

4 図面の簡単な説明

第 1 図は、脱着剤として 0.2 N トリクロロ酢酸及び 0.2 N 塩酸を使用した場合の染色安定性を比較したものである。

特開昭 58-141798 (7)

スベルミジン濃度 0 の場合の吸光度 0.022 をブランク値として、スベルミジン濃度 C (μM) と OD_{514} との関係式を求めた結果 III 式のようになった。

$$C = \frac{\text{OD}_{514} - 0.022}{0.01356} \quad (\mu\text{M}) \quad \text{III}$$

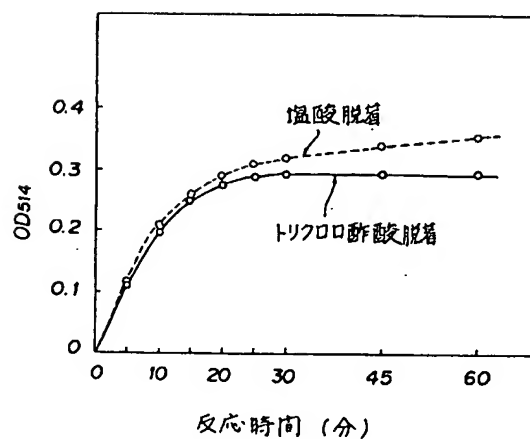
実施例 - 3

実施例 - 1 に示した中で、添加するスベルミジン濃度を未知濃度とした以外は実施例 - 1 に示したものと同一の操作を行なつて、30 分後の 514 nm の吸光度 OD_{514} を求め、実施例 - 2 で求めた III 式の校正線を用いて尿中スベルミジンの定量を行なつた。

また、同時に、トリクロロ酢酸によつて脱着されたスベルミジン溶液を高速度液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析することにより、尿中スベルミジン濃度を求めた。

これら両者の分析結果を第 4 表に示した。

第 1 図



手続補正書

昭和57年6月24日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和57年特許願第 22699号

2. 発明の名称

ポリアミンの分析法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 山口県徳山市御影町1番1号

名 称 (318) 徳山曹達株式会社

代表者 福 田 克 己

連絡先 東京都港区西新橋1の4の5

徳山曹達株式会社東京本部特許情報部

電 話 591-9361

4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」及び「図面の簡単な説明」の欄

特 許

特開昭58-141798 (8)

6. 補正の内容

(1) 明細書第2頁3行目の「1975年」を「1971年」に補正する。

(2) 同第3頁の3行目と4行目の「ブトレミン」を「ブトレシン」に補正する。

(3) 同第3頁7行目の「イオロジカル」を「バイオロジカル」に補正する。

(4) 同第4頁9行目の「校察」を「校正」に補正する。

(5) 同第4頁15行目の「号」を「18984号」に補正する。

(6) 同第7頁12行目の「1.0 Nであるが、特に0.2~0.5 N」を「1.0 Mであるが、特に0.2~0.5 M」に補正する。

(7) 同第10頁15行目の「ブトレシン」を「ブトレシン」に補正する。

(8) 同第15頁4~5行目の「コーン、ステイビ、リカー」を「コーン・ステイブ・リカー」に補正する。

(9) 同第16頁12行目の「処理リゾチーム」

を「処理、リゾチーム」に補正する。

00 同第17頁8行目の「バイオレックス70」を「バイオレックス70」に補正する。

00 同第17頁12行目の「0.2 N」を「0.2 M」に補正する。

00 同第17頁16行目の「ブトレシン」を「ブトレシン」に補正する。

00 同第20頁4行目の「0.2 N」を「0.2 M」に補正する。

00 同第24頁2行目の「m M」を「μ M」に補正する。

00 同第25頁10行目の「0.2 N」を「0.2 M」に補正する。

以上